

原 著 モルヒネ誘発性便秘モデルマウスにおいて 大建中湯はカハール介在細胞の減少を抑制する

¹⁾ 昭和大学医学部生理学講座（生体制御学部門）

²⁾ 昭和大学医学部皮膚科学講座

³⁾ 昭和大学医学部麻酔科学講座

⁴⁾ 昭和大学医学部東洋医学科

⁵⁾ 昭和大学医学部耳鼻咽喉科学講座

⁶⁾ 昭和大学医学部内科学講座（神経内科学部門）

芳田 悠里^{1,2)} 砂川 正隆^{*1)} 草 柳 肇¹⁾

金木 清美¹⁾ 北村 敦子¹⁾ 岡田まゆみ³⁾

時田江里香^{4,5)} 岩波 弘明^{4,6)} 堀部 有三^{4,6)}

石野 尚吾^{1,4)} 久 光 正¹⁾

抄録：大建中湯は、腹痛や腹部膨満感また術後のイレウスの予防などに用いられている漢方薬である。モルヒネ誘発性便秘に対する臨床報告は散見されるが、その至適投与量や投与時期については明確にされていない。また、腸管のペースメーカー細胞であるカハール介在細胞（以下ICC）がモルヒネ投与によってどのように変化し、また大建中湯がそこに与える影響についての報告はない。本研究では、マウスモルヒネ誘発性便秘モデルを用いて大建中湯の有効性ならびに作用機序の検討としてICCの変化を調べた。1) 雄性C57BL/6Jマウスに対し塩酸モルヒネ（10 mg/kg）を10日間連続皮下注射することによりモルヒネ誘発性便秘モデルを作製した。大建中湯（30, 75, 150, 300, 500 mg/kg/day）を投与し排便量を測定したところ、大建中湯（75 mg/kg）投与によってのみ排便量の低下が有意に抑制された。次に、同種マウスより上部小腸ならび直腸を摘出し腸管運動を記録した。Krebs液に希釈した大建中湯（2%, 4%, 10%）を直接投与したところ、いずれも2%では明らかな変化はなかったが、上部小腸は4%で収縮が促進し、10%では抑制された。また直腸は4%または10%の投与で、用量依存的に運動が抑制された。2) 大建中湯投与時期（モルヒネ投与60分前、同時、60分後）を変えて排便量を測定した。大建中湯をモルヒネ投与60分前または同時に投与した群と比較し、モルヒネ投与60分後に投与した群では排便量が有意に抑制された。3) 作用機序の検討のため、コントロール群、大建中湯（75 mg/kg）のみを投与した群、モルヒネ誘発性便秘モデル群、モルヒネ誘発性便秘モデルに大建中湯（75 mg/kg）を投与した群の4群に分け、Tail Flick Testにて熱刺激に対する疼痛閾値を測定した。大建中湯の投与はモルヒネの鎮痛作用に影響しなかった。次に、同様に群分けしたマウスより上部小腸と直腸を摘出し、ICCの変化を免疫組織学的に調べた。c-kit抗体を用いてICCを検出し、腸管壁筋層にあるICC数をカウントした。上部小腸、直腸ともにモルヒネ投与によってICC数は減少したが、大建中湯投与によってその減少は有意に抑制された。大建中湯（75 mg/kg）の投与はモルヒネ慢性投与による排便量の低下を有意に改善したが、それ以上の高用量の投与では効果は認められなかった。また、モルヒネ投与後に大建中湯を投与しても効果が得られなかったことから、十分な大建中湯の効果を引き出すには、投与量や投与のタイミングが大切であると考えられる。次に作用機序を検討した。大建中湯は、モルヒネの鎮痛作用を阻害しなかったことから、オピオイド受容体に対する阻害作用はなく、ICC減少の抑制が関与していると考えられる。

キーワード：大建中湯, モルヒネ, 便秘, カハール介在細胞, c-kit

*責任著者

大建中湯は中国の古典「金匱要略」を出典とする漢方薬で、元来は冷え症で虚弱な人の便秘や下痢、腹痛などに用いられてきたが、現在では、腹部外科手術後の腹痛やイレウスの予防や治療、過敏性腸症候群などに対しても用いられている^{1,2)}。構成生薬は、人參、乾姜、山椒、膠飴の四味で、個々の生薬の作用機序としては、人參と乾姜は過度の腸蠕動を抑制する一方、山椒と膠飴は促進的に働く^{3,4)}。便秘の場合には山椒と膠飴が促進的に作用し、腸蠕動の亢進により下痢症状を呈するような場合は人參と乾姜が抑制的に作用することにより、漢方薬独特の中庸化作用を示す薬であると考えられている。

大建中湯が消化管運動を促進させる薬理機序としては、セロトニン受容体に作用し遊離促進されたアセチルコリンが、平滑筋のムスカリン受容体を刺激することによる消化管運動促進作用⁵⁾、消化管運動促進ペプチドホルモンであるモチリンの分泌促進作用⁶⁾、またバニロイド受容体に作用し分泌されたカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) やアドレノメデュリン (ADM) による腸管血流の増加や腸管運動の促進作用⁷⁾が報告されている。

モルヒネは癌性疼痛や術後疼痛に対して最も効果的な鎮痛薬であるが、悪心や嘔吐、眠気、消化器症状などの副作用が問題となる。中でも便秘は最も頻発し、多くの患者のQOLを低下させる要因となっている。一般的にモルヒネ誘発性便秘に対しては、センノシドやピコスルファートなどの大腸刺激性下剤、酸化マグネシウムなどの浸透圧性下剤が用いられているが⁸⁾、漢方薬では大建中湯の臨床報告や基礎研究も散見される^{9,10)}。しかし、モルヒネ誘発性便秘に対する大建中湯の至適投与量や投与のタイミングについては確立されていない。本研究では、モルヒネ誘発性便秘に対する大建中湯の適切な投与量や投与時期を明らかにすることを第一の目的とした。

次に作用機序を検討するため、消化管の筋層に存在するカハール介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal: ICC) に着目した。ICCは、腸管のペースメーカーとして機能し、また神経と平滑筋との間に介在して神経伝達を調節する機能も有する¹¹⁾。ICCの障害が糖尿病性胃障害、潰瘍性大腸炎、クローン病、腸閉塞、便秘症などに関与することが報告されている¹²⁻¹⁶⁾。しかし、モルヒネ誘発性便秘とICCとの関与、また大建中湯がICCに与える影響について

は明らかにされていない。

本研究では、モルヒネ誘発性便秘モデルマウスを用い、大建中湯の投与量ならび投与時期を変えて有効性を検討し、次に、モルヒネ誘発性便秘におけるICCの変化ならび、それに及ぼす大建中湯の影響を調べた。

研究方法

1. 実験動物

6週齢 (体重 22～25 g) の雄性 C57BL/6J マウス (日本生物材料センター、東京) を用いた。実験期間中は1匹ずつ代謝ケージに入れ、水および飼料 (CE-2; 日本クレア、東京) は自由摂取とし、12時間ごとの明暗サイクルで飼育し、飼育室は室温 25±1℃、湿度 55±5% に設定した。本実験は昭和大学動物実験委員会の承認の下 (承認番号 01109)、昭和大学動物実験実施指針を遵守して行った。

2. 大建中湯の投与量の影響

1) *in vivo*

マウスモルヒネ誘発性便秘モデルを作製し、大建中湯の投与量を変えて効果の検討を行った。マウスを無作為に、コントロール群 (CON)、モルヒネ誘発性便秘モデル群 (MOR)、モルヒネ誘発性便秘モデルに大建中湯を投与した群 (MOR+DKT)、大建中湯 (75 mg/kg) のみを投与した群 (DKT) に分けた (Table 1)。なお、モルヒネ誘発性便秘モデルに対する DKT の投与量は、30, 75, 150, 300, 500 mg/kg とした。MOR 群と MOR+DKT 群は、塩酸モルヒネ (10 mg/kg/day: 武田薬品工業、大阪) を10日間連続で皮下投与し、モルヒネ誘発性便秘モデルを作製した¹⁷⁾。CON 群と DKT 群には、同期間、生理食塩水を投与した。

大建中湯 (TJ-100: Lot No. 2080100010) (ツムラ、東京) はエキス原末を水に溶解し、モルヒネまたは生食投与 60 分前に、経口投与した。実験開始の3日前から実験期間 (10日間) を通して毎日の排便重量 (g) を測定し、モルヒネ投与開始前後で量の変化を調べた。

2) *in vitro*

マウスの摘出腸管の自発運動に対する DKT 直接投与の影響を検討した。無処置の C57BL/6J マウス (5匹) からペントバルビタール深麻酔下 (50 mg/kg i.p.: ソムノペンチル®; 共立製薬、東京) に上

Table 1 Groups of experiment

Groups	n	DKT (p.o.)	Morphine (s.c.)
Control (CON)	6	0 mg (water)	0 mg (saline)
DKT (75mg)	6	75 mg/kg	0 mg (saline)
Morphine (MOR)	7	0 mg (water)	10 mg/kg
MOR + DKT (30 mg)	6	30 mg/kg	10 mg/kg
MOR + DKT (75 mg)	7	75 mg/kg	10 mg/kg
MOR + DKT (150 mg)	7	150 mg/kg	10 mg/kg
MOR + DKT (300 mg)	6	300 mg/kg	10 mg/kg
MOR + DKT (500 mg)	6	500 mg/kg	10 mg/kg

Daikenchuto (DKT) was administered orally one hour before the morphine subcutaneous injection.

部小腸（胃幽門部から約 1 cm 部分）と直腸（肛門から約 1 cm 部分）を摘出。灌流させた Krebs 液中に腸管をつるして、その自発運動を記録した。次に、Krebs 液に溶解した 3 種類（2%, 4%, 10%）の濃度の大建中湯を、低濃度のものから順番に灌流させ、腸管運動の変化を記録した。

3. 大建中湯投与時期の影響

大建中湯の投与の投与時期が排便量に影響するかを検討した。モルヒネ誘発便秘モデルマウス 12 匹を、大建中湯をモルヒネ投与前に投与する群 (PRE) と同時に投与する群 (SIMUL), モルヒネ投与後に投与する群 (POST) の 3 群に（各 n = 4）無作為に分けた。方法は 2. 1) *in vivo* 実験と同様に、マウスに塩酸モルヒネ（10 mg/kg/day）を 10 日間連続投与し、排便量を記録した。PRE 群にはモルヒネ投与 60 分前に、SIMUL 群にはモルヒネ投与と同時に、POST 群にはモルヒネ投与から 60 分後に大建中湯（75 mg/kg/day）を経口投与した。

4. 大建中湯の作用機序の検討

1) モルヒネの鎮痛作用に対する大建中湯の影響

大建中湯の作用が、モルヒネ受容体への阻害によるものかを検討するために、モルヒネの鎮痛作用に対する大建中湯の影響を検討した。6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 28 匹を無作為にコントロール群 (CON), モルヒネ誘発性便秘モデル群 (MOR), モルヒネ誘発性便秘モデルに大建中湯（75 mg/kg）を投与した群 (MOR+DKT), 大建中湯（75 mg/kg）のみを投与した群 (DKT)（各 n = 7）に分けた。大建中湯の投与はモルヒネ投与 60 分前に、モル

ヒネ投与 30 分後に、Tail Flick Test（Cut off time ; 10 秒）にて熱刺激に対する疼痛閾値を測定した。実験は 14 日間連続で行った。

2) カハール介在細胞 (ICC) に対する大建中湯の影響

ICC に対する影響を免疫組織学的に検討した。ICC は受容体型チロシンキナーゼ蛋白 c-kit を発現することから、ICC の検出には抗 c-kit 抗体を用いた¹⁸⁾。前実験と同様に、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 20 匹を無作為に CON 群, DKT (75 mg) 群, MOR 群, MOR+DKT (75 mg) 群、（各 n = 5）の 4 群に分けた。10 日間連続でモルヒネ投与を行った後、2. 2) *in vitro* 実験と同様に上部小腸と直腸を摘出した。速やかに 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、通法により蛍光免疫染色を行った。凍結切片（厚さ 10 μ m）を作製し、一次抗体（4℃, overnight）（1 : 100, rabbit anti-c-kit antibody; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA）, ならびに二次抗体（室温, 2 時間）（1 : 1000, Alexa Fluor[®] 555 Donkey Anti-Rabbit Antibody, Life Technologies, CA, USA）と反応させた。最後に 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI)（室温, 10 分）（1 : 2000, Life Technologies）にて核染色を行い、退色防止用封入剤（H-1000; VECTOR LABORATORIES, CA, USA）を用い封入した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000D ; オリンパス, 東京）にて観察し、腸管壁の写真（ $\times 600$ ）を、無作為に部位を選択し、各動物 10 枚ずつ撮影した。細胞数は、同一エリア（200 \times 200 μ m）内にある DAPI 陽性の核を含む

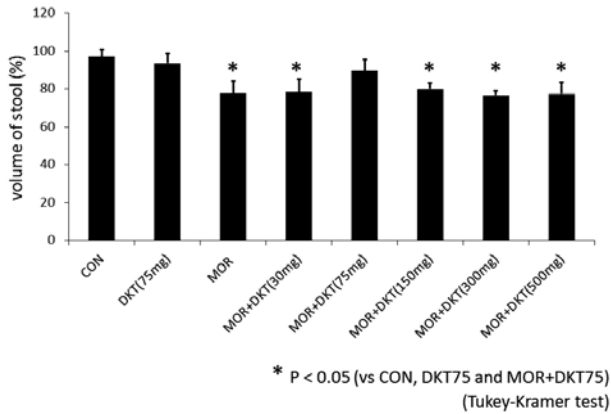


Fig. 1 Effects of Daikenchuto on mice with constipation induced by morphine

CON: control group, DKT: Daikenchuto treated group, MOR: morphine administered group, MOR + DKT: DKT treated MOR group. The volume of stool is expressed as a percentage (the average stool volume over 10 days after the morphine injection / the average stool volume over 3 days before the injection). The volume of stool was significantly decreased by the administration of morphine. Only the administration of DKT (75 mg/kg) inhibited the decrease in the volume of stool.

ICC の数を、群分けを知らされていない第三者がカウントし、10 枚の平均値を個の値とした。

5. 統計学的処理

すべての実験結果は平均±標準偏差で示し、Tukey 法または Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、有意水準は 5%未満とした。

結 果

1. 大建中湯の投与量の影響

1) *in vivo*

排便量の変化は、実験開始前 3 日間の排便量の平均重量 (g/day) に対し、モルヒネ投与開始から 10 日間の平均重量 (g/day) を百分率 (%) で示した (Fig. 1)。10 日間のモルヒネ連続投与により、CON 群 ($97.09 \pm 3.43\%$) と比較し MOR 群の排便量 ($77.64 \pm 6.65\%$) は有意に減少した ($P < 0.05$) が、大建中湯 (75 mg/kg/day) の投与によりその低下は有意に抑制された ($89.79 \pm 5.86\%$) ($P < 0.05$, vs MOR)。他の投与量では、排便量の低下を抑制する作用は認められなかった。なお、CON 群と DKT (75 mg) 群 ($93.50 \pm 5.38\%$) では差はみられなかった。また、CON 群とモルヒネを投与した群との間で、実験期間中は食欲に有意な差はなかった。

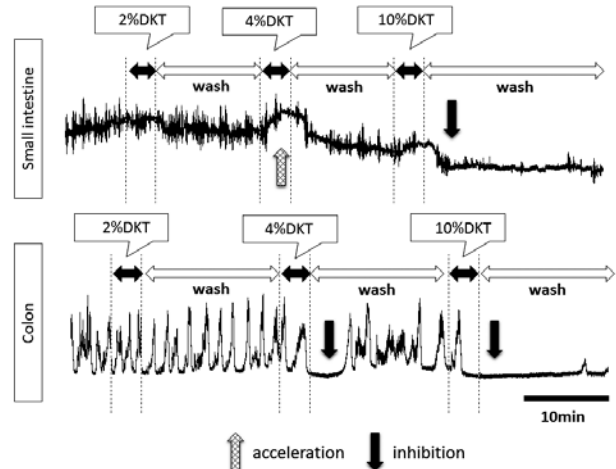


Fig. 2 Direct effects of Daikenchuto (DKT) on the excised bowel motilities in Krebs solution

The administration of 2% DKT did not produce noticeable changes in the motilities of the small intestine and colon. The motility of the small intestine was accelerated by 4% DKT but inhibited by 10% DKT. The motility of the colon was inhibited by 4% and 10% DKT.

2) *in vitro*

5 匹の動物から腸管を摘出し、大建中湯を直接投与したところ、いずれの腸管でも同様の結果が得られた。代表的なデータを Fig. 2 に示す。上部小腸に対して大建中湯を直接投与したところ、2%大建中湯では腸管運動に変化はなかったが、4%では収縮が促進し、10%では抑制された。また直腸に対しては、2%では変化はなかったが、4%または 10%の投与では、大建中湯の用量依存的に運動が抑制された。腸管の部位によっても反応は異なるが、高用量の大建中湯の投与は腸管運動を抑制することが示唆された。

2. 大建中湯投与時期の影響

大建中湯の前投与 (PRE 群) ($91.65 \pm 6.73\%$) あるいは同時投与 (SIMUL 群) ($88.70 \pm 1.78\%$) と比較し、モルヒネ投与後の投与 (POST 群) ($75.73 \pm 5.62\%$) では、有意に排便量が抑制された ($P < 0.05$) (Fig. 3)。PRE 群と SIMUL 群との間には有意差は認められなかった。

3. 大建中湯の作用機序の検討

1) モルヒネの鎮痛作用に対する大建中湯の影響

マウスに塩酸モルヒネ (10 mg/kg) を連続投与すると、耐性が形成されることが知られている¹⁹⁾。本研究では、7 日目以降に熱刺激に対する閾値の低

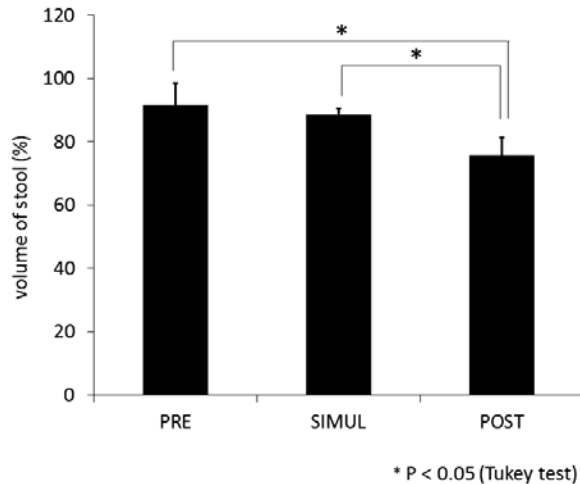


Fig. 3 Appropriate timing of the administration of Daikenchuto (DKT)

DKT was administered before (PRE) or after (POST) the injection of morphine, or simultaneously with the injection of morphine (SIMUL). The volume of stool was significantly decreased in the POST group versus with the PRE and SIMUL groups (* $P < 0.05$).

下が始まったが、MOR 群と MOR+DKT (75 mg) 群とではその変化に差は生じなかった (Fig. 4). CON 群と DKT (75 mg) 群は実験期間中、閾値の変化は認められなかった。モルヒネの鎮痛作用に大建中湯は影響を与えないことが示唆された。

2) ICC に対する大建中湯の影響

上部小腸の組織像を Fig. 5a に、直腸を Fig. 5b に示す。腸管筋層の ICC 数をカウントしたところ、上部小腸の ICC 数は、CON 群 (2.80 ± 1.03 個) や DKT (75 mg) 群 (2.72 ± 0.73 個) と比較し、MOR 群 (0.96 ± 0.48 個) では有意に減少したが、MOR+DKT (75 mg) 群 (2.36 ± 0.58 個) では、その減少が有意に抑制された (Fig. 5c)。直腸も同様に、CON 群 (5.00 ± 1.23 個) や DKT (75 mg) 群 (5.46 ± 0.92 個) と比較し、MOR 群 (2.66 ± 1.11 個) では有意に減少したが、MOR+DKT (75 mg) 群 (5.00 ± 1.37 個) では、その減少が有意に抑制された (Fig. 5d)。いずれも CON 群と DKT (75 mg) 群との間に差は認められなかった。モルヒネ慢性投与による腸管 ICC 数の減少を大建中湯は抑制することが示唆された。

考 察

本研究では、モルヒネ誘発性便秘モデルマウスにおける大建中湯の至適投与量を検討するため排便量

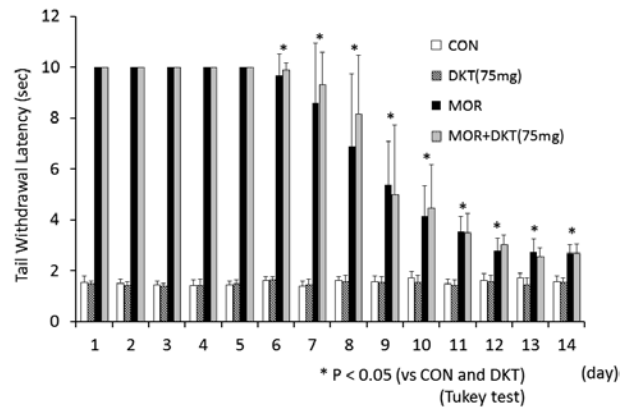


Fig. 4 Thermal pain threshold by the tail flick test
CON: control group, DKT: Daikenchuto treated group, MOR: morphine administered group, MOR + DKT: DKT treated MOR group. The chronic administration of morphine induced tolerance. The pain threshold was increased by the chronic administration of MOR (10mg/kg/day) but decreased after day 7. The change in the threshold was not influenced by the DKT administration.

を測定したところ、大建中湯 (75 mg/kg/day) のみが排便量の低下を有意に抑制し、それよりも高用量では抑制効果は認められなかった (Fig. 2)。摘出した腸管に対する直接作用を調べても、小腸ならび直腸ともに大建中湯の用量依存的に運動が抑制された (Fig. 3)。Kurosawa ら²⁰⁾は、モルモットからの摘出腸管に対し大建中湯 (ツムラ TJ-100) を 0.0025 ~ 2.5% の範囲で直接投与したところ、大腸は用量依存的に収縮が促進し、2.5% で最大の反応を示したと報告している。しかし、ヒトでは最大 1 回につきこの倍量 (15.0 g/day を分 3 で投与する場合、1 回 5.0 g を 100 ml の水で服用したとすると 5.0%) 投与することもある。健常人を用いた Manabe ら²¹⁾の研究では、大建中湯を 7.5 g/day あるいは 15.0 g/day を 5 日間内服させ、RI シンチグラフィ法によって腸管の輸送能を調べたところ、小腸の輸送能では有意差はなかったものの、大腸に関しては 7.5 g/day の投与のみ、プラセボ投与群と比較し有意な促進効果が認められた。動物モデルを用いた *in vivo* ならびに *in vitro* の実験が生体の反応と必ず一致するわけではないが、本研究の結果は Manabe らの報告を支持するものであった。実際に他の動物実験では、大建中湯による消化管運動の抑制作用も報告されている²²⁾。ラットから摘出した直腸を用い、コリン作

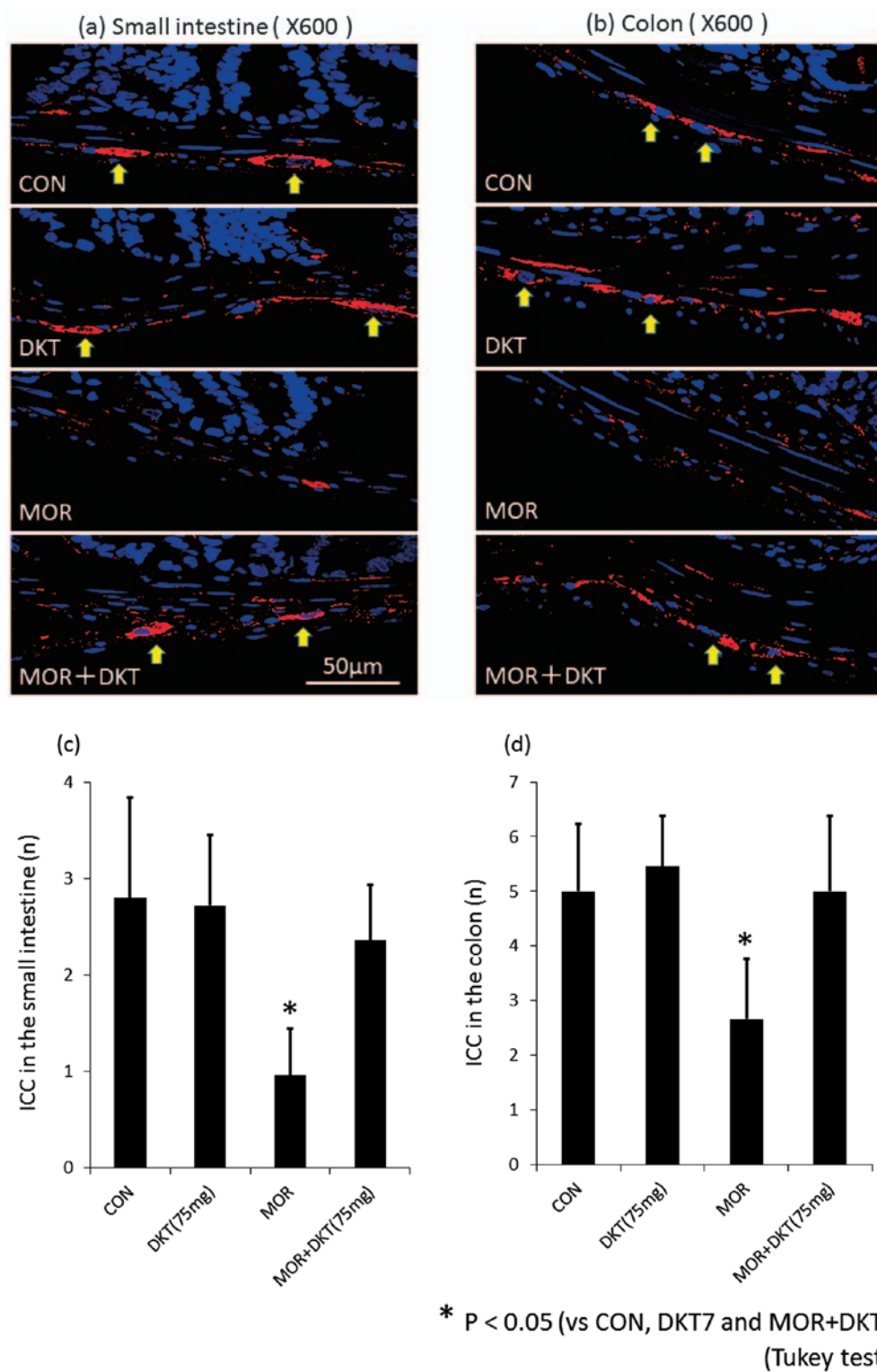


Fig. 5 The changes of interstitial cells of Cajal (ICC)
CON: control group, DKT: Daikenchuto treated group, MOR: morphine administered group, MOR + DKT: DKT treated MOR group. (a) and (c): ICC in the small intestine. (b) and (d): ICC in the colon. The number of ICC in the MOR group was significantly decreased ($*P < 0.05$); however, the decrease was inhibited in the MOR + DKT group. Immunopositivity for c-kit (red), and nuclei labeled with DAPI (blue). ICC was marked with a yellow arrow.

動薬であるカルバコールで収縮させた腸管に大建中湯を投与したところ、30 $\mu\text{m}/\text{ml}$ 以上の高用量では用量依存的に腸管運動を抑制している。方向性の作用を示す西洋薬と異なり、数種類の生薬から構成される漢方薬には、相反する薬理作用を有する成分が含まれているのが一般的で、そのため漢方薬独特の中庸化作用が期待できる。前述のように大建中湯の場合は、生薬単位でみても人参と乾姜は抑制的に、山椒と膠飴は促進的に作用する^{3,4)}。十分な効果が得られない場合、患者の証（体質）に薬が適合していないこともあるが、投与量が患者にとっての至適量ではないかもしれない。効かない場合に増量だけではなく、減量することも検討すべきである。

一般的に漢方薬服用のタイミングは、議論の余地はあるが、食間あるいは食前の服用が推奨されている²³⁾。しかし、モルヒネ投与が原因である便秘に対しては、いつ大建中湯を投与すると効果的かについての検証はされていない。モルヒネ投与 60 分前、同時、60 分後に大建中湯を投与したところ、60 分後では便秘抑制効果が認められなかった (Fig. 3)。樫尾ら²⁴⁾の報告では、モルヒネ (10 mg/kg) をラットへ静脈内投与したところ、約 4 時間大腸運動の低下が持続した。また Nakamura ら⁹⁾の研究では、モルモットからの摘出回腸に対しモルヒネを投与し、腸管運動を抑制させた後に大建中湯を投与したところ、すぐさま運動の回復がみられた。以上より、排便量の低下はモルヒネ投与後の長時間の腸管運動の抑制によるものであり、大建中湯の投与によってその抑制からの回復が可能なことから、大建中湯の投与時期は、モルヒネ投与前、少なくとも同時の投与が望ましいと思われる。

前述のように大建中湯の薬理機序としては、セロトニン受容体⁵⁾やバニロイド受容体⁷⁾を介した作用、また消化管運動のコントロールに関与する消化管ペプチドの分泌促進作用⁶⁾などが報告されている。モルヒネ誘発性便秘特有の病態に対する大建中湯の作用機序としては、Sato ら¹⁰⁾が、モルヒネ誘発便秘患者の消化管ペプチドを調べたところ、CGRP と消化管運動促進ペプチドであるモチリンの濃度が低下していたが、大建中湯が有効であった患者では、それらの低下が抑制されたことを報告している。われわれは、まず大建中湯のオピオイド受容体への作用を調べた。マウスへ 10 日間モルヒネ連続投与し、熱

刺激に対する疼痛閾値を調べたところ、大建中湯はモルヒネの鎮痛作用に影響は与えなかった (Fig. 4)。Nakamura ら⁹⁾も、ホルマリン誘発の急性痛に対するモルヒネの鎮痛作用が大建中湯の影響を受けないことを報告しているが、大建中湯はオピオイド受容体を阻害することによって抗便秘作用をもたらしているのではないことが示唆された。

次に、腸管運動の制御に重要な役割を果たす ICC¹¹⁾に着目した。ICC は規則的な緩徐波を発生し、これによって平滑筋細胞は律動的な自動収縮を行っている。また神経と平滑筋との間に介在して神経伝達を調節する機能を有する ICC も存在する¹¹⁾。モルヒネ誘発性便秘と ICC との関与、また大建中湯が ICC に与える影響については明らかにされていない。本研究では、モルヒネの慢性投与によって、上部小腸ならび直腸腸管壁の ICC 数は有意に減少した (Fig. 5)。糖尿病性胃障害、潰瘍性大腸炎、クローン病、腸閉塞、便秘症などで ICC の障害が報告されているが¹²⁻¹⁶⁾、モルヒネ誘発性便秘においても ICC の障害の関与が示唆された。そして大建中湯の投与は、モルヒネ誘発性便秘における ICC の減少を有意に抑制した。ICC にはコレシストキニンやソマトスタチン、セロトニン、VIP、アセチルコリンなどの受容体の存在が確認されており、ICC の興奮性や神経伝達の調節を行っていると考えられている²⁵⁾。その一つにモチリン受容体もあり²⁶⁾、モチリン受容体作動薬による腸管運動が、ICC を損傷させた腸管では低下した²⁷⁾。モルヒネ誘発性便秘に対する大建中湯の作用機序の一つとして、モチリンの分泌促進が報告されているが¹⁰⁾、モチリンが正常に機能するためには ICC の減少を防ぐとが必要で、そこにも大建中湯が関与していると考えられる。モルヒネ慢性投与が ICC の減少を招く機序、また大建中湯がどのように ICC の減少抑制に関与しているのかは今後更なる研究が必要である。

本研究より、十分な大建中湯の効果を引き出すには、投与量や投与のタイミングが大切であり、具体的には、過量投与になると効果は得られず、投与時期はモルヒネ投与前がよいと考えられる。そして、適切な大建中湯の投与はモルヒネの鎮痛作用を阻害することなく、モルヒネ誘発性便秘に対して効果を示し、その作用機序に ICC の減少抑制が関与していることが示唆された。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Itoh T, Yamakawa J, Mai M, *et al.* The effect of the herbal medicine dai-kenchu-to on post-operative ileus. *J Int Med Res.* 2002;30:428-432.
- 2) 武田宏司, 中川宏治, 武藤修一, ほか. IBS (便秘型) —大建中湯. 診断と治療. 2011;99:817-822.
- 3) Satoh K, Kase Y, Yuzurihara M, *et al.* Effect of Dai-kenchu-to (Da-Jian-Zhong-Tang) on the delayed intestinal propulsion induced by chlorpromazine in mice. *J Ethnopharmacol.* 2003;86:37-44.
- 4) 黒澤 進. 大建中湯による消化管運動の促進作用. 漢方と最新治療. 2003;12:207-212.
- 5) Shibata C, Sasaki I, Naito H, *et al.* The herbal medicine Dai-Kenchu-Tou stimulates upper gut motility through cholinergic and 5-hydroxytryptamine 3 receptors in conscious dogs. *Surgery.* 1999;126:918-924.
- 6) Nagano T, Itoh H, Takeyama M. Effect of Dai-kenchu-to on levels of 3 brain-gut peptides (motilin, gastrin and somatostatin) in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 1999;22:1131-1133.
- 7) Kono T, Koseki T, Chiba S, *et al.* Colonic vascular conductance increased by Daikenchuto via calcitonin gene-related peptide and receptor-activity modifying protein 1. *J Surg Res.* 2008;150:78-84.
- 8) Levy MH. Pharmacologic treatment of cancer pain. *N Engl J Med.* 1996;335:1124-1132.
- 9) Nakamura T, Sakai A, Isogami I, *et al.* Abatement of morphine-induced slowing in gastrointestinal transit by Dai-kenchu-to, a traditional Japanese herbal medicine. *Jpn J Pharmacol.* 2002;88:217-221.
- 10) Satoh Y, Itoh H, Takeyama M. Daikenchuto raises plasma levels of motilin in cancer patients with morphine-Induced constipation. *J Tradition Med.* 2010;27:115-121.
- 11) Chen JH, Zhang Q, Yu Y, *et al.* Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats. *PLoS One.* 2013;8:e60474. (accessed 2014 Dec 10)
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060474> doi:10.1371/journal.pone.0060474.
- 12) Kim ER, Kim KM, Lee JY, *et al.* The clue of Interstitial Cell of Cajalopathy (ICCPathy) in human diabetic gastropathy: the ultrastructural and electrical clues of ICCpathy in human diabetic gastropathy. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64:521-526.
- 13) Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, *et al.* Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. *J Cell Mol Med.* 2012;16:318-327.
- 14) Wang XY, Zarate N, Soderholm JD, *et al.* Ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal and communication with mast cells in Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19:349-364.
- 15) Gfroerer S, Metzger R, Fiegel H, *et al.* Differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns. *World J Gastroenterol.* 2010;16:5716-5721.
- 16) Kashyap P, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, *et al.* Immunoreactivity for Anol detects depletion of Kit-positive interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23:760-765.
- 17) Raehal KM, Walker JK, Bohn LM. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:1195-1201.
- 18) Komuro T, Zhou DS. Anti-c-kit protein immunoreactive cells corresponding to the interstitial cells of Cajal in the guinea-pig small intestine. *J Auton Nerv Syst.* 1996;61:169-174.
- 19) Zhou Q, Wang J, Zhang X, *et al.* Effect of metabotropic glutamate 5 receptor antagonists on morphine efficacy and tolerance in rats with neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2013;718:17-23.
- 20) Kurosawa S, Nishikawa S, Kaneko M, *et al.* The herbal medicine Dai-Kenchu-to contract guinea pig colon muscle while relax the gastric muscle-an evidence of new therapy for paralytic ileus. *Gastroenterology.* 1997;112:A768.
- 21) Manabe N, Camilleri M, Rao A, *et al.* Effect of daikenchuto (TU-100) on gastrointestinal and colonic transit in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298:G970-G975.
- 22) Tulimat MA, Ishiguchi T, Kurosawa S, *et al.* The inhibitory effect of herbal medicine -Dai Kenchu To (DKT)- on the colonic motility in rats in vitro. *Am J Chin Med.* 2001;29:111-118.
- 23) 戸田克広. 漢方薬における食前投与と食後投与の比較. 新薬と臨牀. 2007;56:2034-2038.
- 24) 榎尾明彦, 郭 試瑜, 浅田初枝, ほか. ラット大腸運動に対するモルヒネの影響 in vivo と in vitro での比較. 昭和医会誌. 2008;68:225-231.
- 25) Huizinga JD, Chen JH. Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science. *Curr Gas-*

- troenterol Rep.* 2014;16:363. (accessed 2014 Dec 1)
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11894-013-0363-z> doi:10.1007/s11894-013-0363-z.
- 26) Xu WD, Jiang X, Lan L, *et al.* Long-term culture and cryopreservation of interstitial cells of Cajal. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47:89–98.
- 27) Wang CH, Wang LC, Jiang X, *et al.* Effect of interstitial cells of Cajal on gastrointestinal motility induced by motilin receptor agonist ABT-229. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2010;48:254–259. (in Chinese)

KAMPO MEDICINE “DAIKENCHUTO” PREVENTS THE DECREASE OF INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN MICE WITH CONSTIPATION INDUCED BY MORPHINE

Yuri YOSHIDA^{1,2)}, Masataka SUNAGAWA¹⁾, Hajime KUSAYANAGI¹⁾,
Kiyomi KANEKI¹⁾, Atsuko KITAMURA¹⁾, Mayumi OKADA³⁾,
Erika TOKITA^{4,5)}, Hiroaki IWANAMI^{4,6)}, Yuzo HORIBE^{4,6)},
Shogo ISHINO^{1,4)} and Tadashi HISAMITSU¹⁾

¹⁾ Department of Physiology, Showa University School of Medicine

²⁾ Department of Dermatology, Showa University School of Medicine

³⁾ Department of Anesthesiology, Showa University School of Medicine

⁴⁾ Department of Kampo Medicine, Showa University School of Medicine

⁵⁾ Department of Otorhinolaryngology, Showa University School of Medicine

⁶⁾ Department of Medicine, Division of Neurology, Showa University School of Medicine

Abstract — Daikenchuto (DKT) is a traditional herbal medicine (also referred to as Kampo medicine) which has been used to treat postoperative ileus, intestinal paralysis, stomachache, abdominal distention, constipation and diarrhea. The aim of the study was to clarify the effect of DKT on constipation induced by the chronic administration of morphine and its influence on the morphology and quantity of interstitial cells of Cajal (ICC). 1) Male C57BL/6J mice were injected with morphine hydrochloride (10mg/kg) subcutaneously once a day for 10 days. DKT (30, 75, 150, 300, and 500 mg/kg) was administered 60 min before the injection of morphine. Only the administration of DKT (75mg/kg) inhibited the decrease in the volume of stool. 2) The pain threshold was measured using the tail flick test 30min after the injection of morphine. The administration of DKT did not influence the antinociceptive effect of morphine. 3) The expression of ICC was examined immunohistochemically. The number of ICC in the upper part of the small intestine and the colon were reduced by the chronic administration of morphine; however, the reductions were inhibited due to the administration of DKT (75mg/kg). Because DKT did not prevent the antinociceptive effect of morphine, the effect of DKT is not mediated through blocking the opioid receptor. ICC is known to serve as a “pacemaker” which regulates contraction of the smooth muscle. Our results suggest that the reduction in the number of ICC was involved in morphine-induced constipation and the administration of DKT inhibited the decrease in the volume of stool. Administration of the optimal dose of DKT may prevent morphine-induced constipation.

Key words: Daikenchuto, morphine, constipation, interstitial cells of Cajal, c-kit

〔受付：1月14日，受理：1月26日，2015〕